

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08278305 A**

(43) Date of publication of application: **22 . 10 . 96**

(51) Int. Cl

G01N 33/543

(21) Application number: **07077582**

(22) Date of filing: **03 . 04 . 95**

(71) Applicant: **NIPPON SHOJI KK**

(72) Inventor: **KOIZUMI NAOHISA
KAMITOO NAOKO**

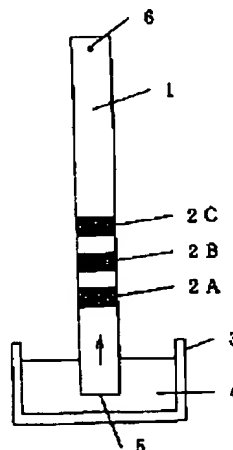
(54) IMMUNOLOGICAL MEASURING INSTRUMENT

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain a device for easily estimating the amount of substance to be inspected semi-quantitatively.

CONSTITUTION: In an immunochromatography device with a porous member 1 for chromatography, a first substance specifically connected to a substance to be inspected is fixed to a plurality regions (2A, 2B, and 2C) in the member 1. A mixed liquid 4 between the substance to be inspected and a second substance which is specifically connected to the substance to be inspected being labeled by particles can be developed in chromatogram from a lower edge 5 of the porous member 1 for chromatography.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-278305

(43)公開日 平成8年(1996)10月22日

(51)Int.Cl.⁹

G 0 1 N 33/543

識別記号

5 2 1

庁内整理番号

F I

G 0 1 N 33/543

技術表示箇所

5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数4 O L (全 5 頁)

(21)出願番号 特願平7-77582

(22)出願日 平成7年(1995)4月3日

(71)出願人 000231394

日本商事株式会社

大阪府大阪市中央区石町2丁目2番9号

(72)発明者 小泉 直久

神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明

治製菓株式会社薬品総合研究所内

(72)発明者 上遠 直子

神奈川県横浜市港北区師岡町760番地 明

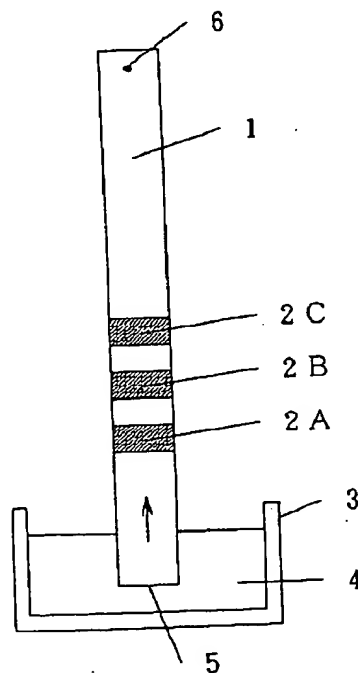
治製菓株式会社薬品総合研究所内

(54)【発明の名称】 免疫学的測定装置

(57)【要約】

【目的】 被検物質の量を半定量的に推定できる簡易な装置を得る。

【構成】 本発明は多孔性のクロマトグラフィー用部材を有する免疫クロマトグラフィー装置であって該多孔性のクロマトグラフィー用部材1は、複数領域(2A, 2B, 2C)に被検物質と特異的に結合する第一の物質が固定されている。被検物質及び粒子で標識された被検物質と特異的に結合する第二の物質との混合液4が、該多孔性のクロマトグラフィー用部材1の下端5よりクロマトグラム状に展開し得る装置。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 被検物質に特異的に結合する第一の物質が検出領域に固定化されている多孔性のクロマトグラフィー用部材の一端より、被検物質に特異的に結合する物質であって、粒子により標識されている第二の物質及び被検物質の混合液を毛管現象により他端方向へ展開し、検出領域においてサンドイッチの原理により被検物質を検出する免疫クロマトグラフィー法において、被検物質に特異的に結合する第一の物質が複数の領域に固定されており、該複数の領域は該混合液が展開する方向に対し直列に並んでいる免疫学的測定装置。

【請求項 2】 第一の物質及び第二の物質が抗体である請求項 1 記載の装置。

【請求項 3】 粒子が金属コロイド粒子又はラテックス粒子である請求項 1 ～ 2 記載の装置。

【請求項 4】 被検物質がヒトヘモグロビン又は hCG である請求項 1 ～ 3 記載の装置

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、多孔性のクロマトグラフィー用部材を有する免疫クロマトグラフィー用装置であって、被検物質に結合する物質が該クロマトグラフィー用部材の複数領域に固定化されており、粒子で標識された被検物質に結合する第二の物質と被検物質の混合液が、展開された時に該領域に起こる反応パターンより被検物質の量を半定量的に推測することのできる装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】生体体液中や糞便中に含有される物質の検出の方法として、免疫学的手法は広く用いられている。近年、特殊な装置や技術を必要とせず、診察室や家庭で簡単に検査が可能な方法が開発されてきている。例えば特表昭 63 - 501595 号や特開昭 63 - 159760 号などに酵素標識抗体を用いたクロマトグラフィー法による糞便中のヒトヘモグロビンの検出装置について記載されている。これらの方法は特殊な装置や器具が要らず、簡単操作で短時間に検査が終了し、しかも結果は判定領域の着色の有無によって表されるので、使用者の熟練を要さず検査が可能である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上記の従来の技術は、被検物質がある量以上存在すると判定部位に着色が起こり、これを確認することによって被検物質の存在を検査する方法であるため、被検物質の量がどの程度なのかは確認できないという欠点があった。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決するために検討を重ねた結果、免疫クロマトグラフィー法において被検物質に反応する物質をクロマトグラフィー用部材の複数ヶ所に展開方向に対し直列に固

定化することにより、被検物質の量を半定量的に検出できることを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明によれば、被検物質の量が少ない時は被検物質に反応する物質の固定化してある複数ヶ所のうち、展開方向に対して前列側の領域が着色し、2 列目以降は順次被検物質の量に依りて着色する。従って何列目まで着色したかを確認することによって、被検物質の量を推定できる。

【0005】本発明における多孔性のクロマトグラフィー用部材は、被検物質を含む液体が展開できるものであれば特に限定されるものでなく、例えばニトロセルロース膜やガラス繊維膜などが使用できる。また、クロマトグラフィー用部材は支持体としてプラスチック等を貼合せてあってもよい。本発明に用いる被検物質と結合する物質としては、抗体、抗原、レクチン等がある。これらを標識する粒子としては金属コロイド粒子、着色したラテックス粒子、菌体粒子などが使用できる。

【0006】本発明における標識された被検物質と結合する物質は懸濁液状でもよく、不織布などに含浸、乾燥されていてもよい。本発明では多孔性クロマトグラフィー用部材に固定化する被検物質と結合する物質を固定化する量は、被検物質の検査に必要な感度に応じて決定すればよく、固定化する複数領域のそれぞれに固定量を定めることができる。

【0007】本発明において被検物質を検査する場合大別して 2 つの方法がある。一方は被検物質と粒子で標識された被検物質と結合する物質を混合後クロマトグラフィー用部材に展開する方法であり、他方は粒子で標識された被検物質と結合する物質を不織布等に含浸乾燥させて、これとクロマトグラフィー用部材の展開開始端とを接触させておき、被検物質の含有した液をこの不織布に滴下することによって展開する方法である。その他の方法として、クロマトグラフィー用部材の展開開始端と固定化領域の間に粒子で標識された被検物質と結合する物質を含浸、乾燥させておく方法なども考えられる。

【0008】以下図面を参照して具体的な構造例の説明をする。

【図 1】は本発明の装置の構成例を示す正面図である。

【図 1】に示す多孔性のクロマトグラフィー用部材 1 は 2 A、2 B、2 C の検出領域に被検物質と特異的に結合する第一の物質が固定化されており、反応容器 3 中に被検物質及び粒子で標識された被検物質と特異的に結合する第二の物質の混合液 4 が入っている。混合液 4 は多孔性クロマトグラフィー用部材 1 の下端（展開開始端）5 より矢印の方向に展開される。

【0009】被検物質と粒子で標識された第二の物質は多孔性クロマトグラフィー用部材 1 上の第一の物質が固定化されている領域 2 A、2 B、2 C で被検物質を介して第一の物質とサンドイッチ状に結合し、粒子の色により着色する。この時着色の度合は、第一の物質の固定量が

2A, 2B, 2Cとも同量であれば、2A部分が最も濃く2Cが最も薄い。被検物質の量が少ない場合は2A部分のみ着色し、被検物質の量に応じて2A, 2Bのみ着色、2A, 2B, 2C全て着色となる。

【0010】第一の物質の固定領域2A, 2B, 2Cの間隔は特に限定されないが通常1.0~10.0mm程度である。また固定領域2A, 2B, 2Cの形状は特に限定されないが通常帯状、線状でありその太さは特に限定されないが通常0.5~3.0mmである。また固定領域2A, 2B, 2Cそれぞれ別の形状や太さであってもよい。固定領域2A, 2B, 2Cに固定化される第一の物質量は特に限定されるものではなく、各領域同量であってもよく、また各々異なってもよい。

【0011】固定領域2Aの位置は混合液4の液量や操作性、検出感度等を考慮して設定すればよく特に限定するものではないが、通常クロマトグラフィー用部材下端（展開開始端）5より10~50mm程度である。固定領域の数は2ヶ所以上であればよいが通常2~5ヶ所である。クロマトグラフィー用部材の幅及び長さは特に限定するものではなく、操作性を考慮して設定すればよいが、通常幅5~10mm長さ30~70mm程度である。

【0012】粒子で標識された被検物質と結合する第二物質の濃度や液量は、被検物質の濃度や液量との相対的な関係により要求される感度や操作性を考慮して設定すればよく、特に限定されるものではない。また、反応容器3の形状はクロマトグラフィー用部材の大きさや混合液4の容量、操作性等を勘案して設定すればよい。

【0013】

【図2】は粒子で標識された被検物質と結合する第二の物質を不織布等に含浸させ、クロマトグラフィー用部材にのせた場合の平面図（

【図2】(A)）及び側面図（

【図2】(B)）である。粒子で標識された被検物質と結合する第二の物質を含浸した部材7は被検物質と結合する第一の物質を固定化した領域2A, 2B, 2Cを有するクロマトグラフィー用部材1の一端（展開開始端）5に接触している。被検物質を含有する液体を部材7に滴下すると被検物質及び粒子で標識された被検物質と結合する第二の物質は混合され、該混合液は矢印の方向に展開し前述のようにクロマトグラフィー用部材1の2A, 2B, 2Cの領域が被検物質の量に応じて着色する。

【0014】粒子で標識された被検物質と結合する第二の物質を含浸した部材7と領域2Aとの間隔は、被検物質の検出に必要な感度や被検物質質量及び操作性等を勘案して設定すればよく、特に限定するものではない。ただし部材7は領域2Aに直接接触してはならない。部材7はクロマトグラフィー用部材1と全部または一部接触しており、その接触面積は特に限定するものではなく、操作性等を考慮して設定すればよい。部材7とクロマトグラフィー用部材1を保持するために適当な形状のハウジ

ングを設けることも可能であるが、該ハウジングには被検物質を含有する液を部材7に滴下するための開口部があり、また領域2A, 2B, 2Cの着色の有無が確認できるよう透明または開口している必要がある。

【0015】

【実施例】

【図1】に示した構成の装置について被検物質がヒトヘモグロビンである場合の実施例を記載する。

【0016】実施例1

10 抗ヒトヘモグロビン抗体固定化クロマトグラフィー用部材の調製

幅5mm長さ50mmに裁断したプラスチック貼合ニトロセルロース膜（S&S社）の一端（展開開始端）5から10mmの位置に生理食塩液で5倍希釈した抗ヒトヘモグロビン抗体（ウサギ由来 DAKO社製）を、ガラス製キャピラリーを用いて長手方向に対しほぼ垂直にニトロセルロース膜の側端から側端面まで直線状に太さ約1mmに塗布し第一領域（2A）とした。ニトロセルロースの他端には油性インクで印6をつけた。次いで第一領域（2A）より5mm離れた位置（即ち一端5より16mm）に同様に塗布し第二領域とし（2B）、更に第二領域から5mm離して（即ち一端5より22mm）同様に塗布し第三領域（2C）とした。室温に30分静置し乾燥後、1%牛血清アルブミン入り50mMリン酸緩衝液pH7.2に1時間浸漬し、濾紙上にて室温5時間静置し乾燥させた。

【0017】金コロイド粒子の調製

95℃の蒸留水 500mlに10%塩化金酸溶解液（HAuCl₄・4H₂O）を攪拌しながら加えた。1分後に2%クエン酸ナトリウム溶液5mlを加え、更に20分間攪拌した後30℃に冷却した。冷却後、0.1M炭酸カリウム溶液でpHを7.0とし、安定剤として1%PEG20000を1ml加え、10分間攪拌した後0.22μmミリポアフィルターで濾過した。

【0018】金コロイド標識抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体の調製

抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体MSMU-110（日本バイオテスト研究所）を10mM HEPES（pH7.1）で希釈して200μg/mlの濃度とした。この溶液3ml及び上記により調製した金コロイド液30mlを遠沈管に採り、十分攪拌した。次にA1バッファー（10mM HEPES, 0.3M D-マンニトール, 0.05%PEG20000, 0.1%BSA, pH7.1）を3.3ml加え、1時間攪拌した後10℃, 9000rpmで10分間遠心分離し、その上清部を別の遠沈管に採取し、10℃, 15000rpmで30分間遠心分離した。同様の操作を2回行い得られた沈澱物にA1バッファー10mlを加えた。

【0019】ヒトヘモグロビンの測定

ヒトヘモグロビン（SIGMA社製）をA1バッファーに溶解し、濃度0.05, 0.2, 1.0, 10.0μg/mlのヒト

ヘモグロビン溶液を調製した。これらヒトヘモグロビン溶液 100 μ l と上記により調製した金コロイド標識抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体 100 μ l をガラス試験管（内径8mm、長さ50mm）に入れ、混合後上記により調製した抗ヒトヘモグロビン抗体固定化クロマトグラフィー用部材を、油性インクの印部6を上にして下端*ヒトヘモグロビン濃度（ μ g/ml）

0.05
0.2
1.0
10.0

【0021】実施例2

【図2】に示した構成の装置について被検物質がヒトヘモグロビンである場合の実施例を記載する。

【0022】抗ヒトヘモグロビン抗体固定化クロマトグラフィー用部材の調製

幅7mm長さ70mmに裁断したプラスチック貼合ニトロセルロース膜（S&S社）の一端（展開開始端）5から20mmの位置に生理食塩液で5倍に希釈した抗ヒトヘモグロビン抗体（ウサギ由来 DAKO社製）を、ガラス製キャピラリーを用いて長手方向に対しほぼ垂直にニトロセルロース膜の側端から側端面まで直線状に太さ約1mmに塗布し第一領域（2A）とした。ニトロセルロースの他端には油性インクで印6をつけた。次いで第一領域（2A）より3mm離れた位置（即ち一端5から24mm）に生理食塩液で10倍に希釈した抗ヒトヘモグロビン抗体（ウサギ由来 DAKO社製）を同様に塗布し第二領域（2B）とした。更に第二領域から3mm離れた位置（即ち一端5から28mm）に生理食塩液で20倍に希釈した抗ヒトヘモグロビン抗体（ウサギ由来 DAKO社製）を同様に塗布し第三領域（2C）とした。室温に30分静置し乾燥後、1%牛血清アルブミン入り50mMリン酸緩衝液 pH 7.2に1時間浸漬し、濾紙上にて室温5時間静置し乾燥させた。

ヒトヘモグロビン濃度（ μ g/ml）

0.05
0.2
2.0
20.0

【0026】

【発明の効果】本発明により特殊な装置を用いず、簡易に短時間で被検物質を検出することができ、複数の抗体固定領域の着色の度合を確認することにより、被検物質の量を半定量的に推定できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の免疫学的測定装置の構成例を示す正

*が上記混合液に接するように挿入した。室温で10分間静置した後抗体固定領域（2A、2B、2C）の着色状態を肉眼にて確認した。着色が認められた場合を+、着色が認められなかった場合を-として結果を表1に示す。

【0020】

【表1】

抗体固定領域

第一領域 第二領域 第三領域
(2A) (2B) (2C)

- - -
+ - -
+ + -
+ + +

※【0023】金コロイド標識抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体含浸パッドの調製

ガラスフィルター（アドバンテック東洋社製）を7×10mmに裁断した。これに実施例1で調製した金コロイド標識抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体を100 μ l含浸させ、凍結乾燥機（LABCONCO社製）を用いて24時間凍結乾燥した。

【0024】ヒトヘモグロビンの測定

抗ヒトヘモグロビン抗体固定化クロマトグラフィー用部材のプラスチック部分を下にし、油性インクで印6の付いていない一端（展開開始端）5の部分に金コロイド標識抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体含浸パッド7を乗せた。ヒトヘモグロビン（SIGMA社製）をA1バッファーに溶解し、濃度0.05、0.2、2.0、20.0 μ g/mlのヒトヘモグロビン溶液を調製した。これらのヒトヘモグロビン溶液 200 μ l を金コロイド標識抗ヒトヘモグロビンモノクローナル抗体含浸パッド7に滴下し、室温で10分間静置した後抗体固定領域（2A、2B、2C）の着色状態を肉眼にて確認した。着色が認められた場合を+、着色が認められなかった場合を-として結果を表2に示す。

【0025】

【表2】

抗体固定領域

第一領域 第二領域 第三領域
(2A) (2B) (2C)

- - -
+ - -
+ + -
+ + +

面図である。

【符号の説明】

- 1 …多孔性クロマトグラフィー用部材
- 2A…第一物質固定化 第一領域
- 2B…第一物質固定化 第二領域
- 2C…第一物質固定化 第三領域
- 3 …反応容器

4 …被検物質及び粒子標識第二物質の混合液

5 …展開開始端

6 …油性インク印

【図2】 本発明の免疫学的測定装置の別の構成例を示す正面図（A）及び側面図（B）である。

【符号の説明】

1 …多孔性クロマトグラフィー用部材

* 2 A…第一物質固定化 第一領域

2 B…第一物質固定化 第二領域

2 C…第一物質固定化 第三領域

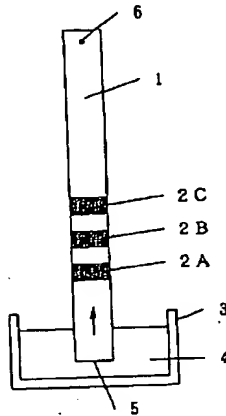
5 …展開開始端

6 …油性インク印

7 …粒子標識第二物質含浸パッド

*

【図1】



【図2】

